

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année scolaire 1919-1920, — N° 240

TRAVAIL DU LABORATOIRE DE MÉDECINE EXPÉRIMENTALE ET COMPARÉE

RECHERCHES
CYTOLOGIQUES EXPÉRIMENTALES
SUR LES
CORYNÉBACTÉRIES
(Bacilles diphtériques et pseudo-diphtériques)
ÉTUDE
SUR LES
CORPUSCULES MÉTACHROMATIQUES

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Et soutenue publiquement le 17 juin 1920

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Gabriel RICHARD

LICENCIÉ ÈS SCIENCES

Né à Lyon, le 25 juillet 1885



LYON

IMPRESSIONS-ÉDITIONS DES DEUX-COLLINES

3, RUE DAVOUT, 3

—
Juin 1920

RECHERCHES
SUR LES
CORYNÉBACTÉRIES

DU MÊME AUTEUR :

Influence du glucose sur la vitalité du « *Tripanosama lewisi* » *in vitro*. En collaboration avec C. BIOT et R. BIOT (*Société de Biologie*, 4 novembre 1911).

De la possibilité d'inoculer le « *Tripanosama lewisi* » à d'autres animaux que le rat. En collaboration avec R. BIOT (*Société de pathologie exotique*, 11 décembre 1912).

Modifications hémoleucocytaires sous l'influence de l'émanation du radium. En collaboration avec le D^r REBATTU (*Journal médical français*, 15 juin 1913).

Sur la coloration vitale des corpuscules métachromatiques du bacille diphtérique. En collaboration avec le Professeur F. ARLOING (*Société de Biologie*, Réunion de Lyon, 16 février 1920).

Apparition de corpuscules métachromatiques chez les bacilles pseudodiphtériques, conditions de culture favorisantes. En collaboration avec le Professeur F. ARLOING (*Société de Biologie*, Réunion de Lyon, 15 mars 1920).

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année scolaire 1919-1920. — N° 240

TRAVAIL DU LABORATOIRE DE MÉDECINE EXPÉRIMENTALE ET COMPARÉE

RECHERCHES
CYTOLOGIQUES EXPÉRIMENTALES

SUR LES

CORYNÉBACTÉRIES

(Bacilles diphtériques et pseudo-diphtériques)

ÉTUDE

SUR LES

CORPUSCULES MÉTACHROMATIQUES

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Et soutenue publiquement le 17 juin 1920

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Gabriel RICHARD

LICENCIÉ ÈS SCIENCES

Né à Lyon, le 25 juillet 1885



LYON

IMPRESSIONS-ÉDITIONS DES DEUX-COLLINES

3, RUE D'AVOUT, 3

Juin 1920



PERSONNEL DE LA FACULTE

MM. HUGOUNENQ..... DOYEN
J. LÉPINE..... ASSESSEUR.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. AUGAGNEUR, SOULIER, CAZENEUVE, PIERRET.
BEAUVISAGE, LACASSAGNE, MORAT, TESTUT, POLLOSSON (M)

PROFESSEURS

Cliniques médicales.....	MM. TEISSIER.
Cliniques chirurgicales.....	ROQUE.
Clinique obstétricale et Accouchements.....	BARD.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.....	TIXIER.
Clinique ophtalmologique.....	BÉRARD.
Clinique des maladies nerveuses et mentales.....	FABRE.
Clinique des maladies des enfants.....	ROLLET.
Clinique des maladies des femmes.....	NICOLAS.
Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie.....	LEPINE (J.)
Chimie biologique.....	WEILL.
Chimie organique et Toxicologie.....	POLLOSSON (A.)
Matière médicale et Botanique.....	CLUZET.
Parasitologie et Histoire naturelle médicale.....	HUGOUNENQ.
Anatomie.....	MOREL.
Anatomie générale et Histologie.....	MOREAU.
Physiologie.....	GUIART.
Pathologie interne.....	LATARJET.
Pathologie et Thérapeutiques générales.....	POLICARD.
Anatomie pathologique.....	DOYON.
Médecine opératoire.....	COLLET.
Médecine expérimentale et comparée.....	MOURIQUAND.
Médecine légale.....	PAVIOT.
Hygiène.....	X.
Thérapeutique.....	ARLOING (F.)
Pharmacologie.....	ETIENNE MARTIN.
	COURMONT (P.)
	PIC.
	FLORENCE.

PROFESSEURS ADJOINTS

Maladies des oreilles, du nez et du larynx.....	MM. LANNOIS.
Pathologie externe.....	VALLAS.
Maladies des voies urinaires.....	ROCHET.
Propédeutique de gynécologie.....	CONDAMIN.

CHARGÉS DE COURS COMPLÉMENTAIRES

Chimie minérale.....	MM. BARRAL.	agréé
Chirurgie infantile.....	NOVE-JOSSERAND,	—
Accouchements.....	COMMANDEUR,	—
Embryologie.....	X...	—
Anatomie topographique.....	PATEL,	—
Botanique.....	BRETIN,	—
Chirurgie expérimentale.....	VILLARD,	—
Clinique infantile.....	X...	—
Déontologie et médecine professionnelle.....	X...	—

AGRÉGÉS

MM.	MM.	MM.	MM.
BARRAL,	LERICHE.	SAVY,	BONNAMOUR, chargé
COMMANDEUR,	THEVENOT (Léon)	FROMENT.	des fonctions,
NEVEU-LEMAIRE,	TAVERNIER,	THEVENOT (Lucien).	SARVONAT, id.
LAROYENNE,	CADE,	PIERY,	FAVRE, id.
VORON.	GUILLEMARD,	COTTE,	GRAVIER, id.
NOGIER,	GARIN,	DUROUX,	ROUBIER, id.
BRETIN,			

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM. ARLOING, Président ; CADE, Assesseur ;
MM. FROMENT et THÉVENOT LUCIEN, Agrégés.

M. BAYLE, secrétaire.

La Faculté de médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

A M. LE PROFESSEUR FERNAND ARLOING

PROFESSEUR DE MÉDECINE EXPÉRIMENTALE ET COMPARÉE

En témoignage de mon affectueuse
reconnaissance.

A MES MAÎTRES DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

A MES MAÎTRES DE LA FACULTÉ DES SCIENCES



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AVANT-PROPOS

« Expérimentez et vous direz
ce que vous aurez vu ».

MAGENDIE.

La pluralité des aspects pouvant revêtir un même être vivant est un des phénomènes biologiques qui attire le plus l'attention d'un observateur.

Le polymorphisme peut être considéré comme le résultat du travail intime de la cellule, réagissant aux influences des forces ambiantes.

A une variation de forme correspond parfois une modification cytologique dont il devient intéressant d'étudier les corrélations.

Parmi les organismes les plus inférieurs, certaines bactéries pathogènes, et, en particulier, les bacilles diphtériques et pseudo-diphtériques, présentent, à ce titre, des exemples remarquables et faciles à étudier, précisément en raison de leur évolution rapide en cultures.

Si quelques détails de leur structure cytoplasmique tels que les corpuscules métachromatiques, sont depuis

longtemps connus et utilisés en bactériologie clinique, il ne semble pas que l'on ait cherché à en établir l'origine, la valeur, la signification physiologique autant qu'on a réussi à le faire pour d'autres microorganismes comme les levures.

Surtout au moment où la guerre donnait une actualité pressante à ces questions, des recherches très nombreuses et très importantes ont eu lieu relativement à la virulence, au pouvoir fermentatif, à la coloration, au diagnostic précoce.

L'ensemble de ce travail a une autre tendance : en étudiant la cytologie des bacilles diphtériques et pseudo-diphtériques, nous pensions que ces bacilles, appartenant au groupe des corynébactéries, ont, non seulement les affinités les plus remarquables avec d'autres agents pathogènes importants (tels ceux de la morve, de la tuberculose, de l'actinomycose), mais qu'ils présentent encore des degrés de similitude intéressants avec les types les plus inférieurs des champignons.

Nous avons donc cherché, au moyen d'une série d'observations patientes et comparatives, à discerner les influences expérimentales pouvant modifier l'aspect de ces bacilles, notamment en ce qui concerne leur cytologie et les corpuscules métachromatiques, puis nous avons étudié les relations pouvant exister entre ces variations de caractères et leurs propriétés biologiques.

Ce sont là des sujets touchant autant à la Botanique, à la Bactériologie, qu'à la Médecine Expérimentale.

Préparé par nos études de sciences naturelles d'une part, nous étions aussi entraîné vers ces recherches par les enseignements de l'Ecole lyonnaise, les

idées de Chauveau, de S. Arloing, les expériences de Charin et de Lesieur.

Aussi ce fut pour nous comme une concordance heureuse d'être accueilli avec tant de bienveillance par M. le professeur S. Arloing dans le laboratoire de Médecine expérimentale pour étudier ces questions, et d'avoir l'honneur de reprendre une collaboration brutalement interrompue par la guerre.

Une part importante de ce travail est due aux précieuses indications et aux savants conseils de M. Guilhaumon, maître de conférences à la Faculté des Sciences, qui nous a donné, avec la plus grande amabilité, les renseignements indispensables sur de nombreux points de cytologie bactérienne et mycologique où sa compétence est universellement connue.

Nous sommes reconnaissant à M. le professeur agrégé L. Thévenot de l'intérêt qu'il nous a témoigné au cours de ces recherches, et nous remercions le docteur Langeron et le docteur Durand des renseignements utiles ainsi que des cultures fournies si obligeamment.

Si nous avions cédé à notre intention première de relater ici la complexité de nos recherches, la multiplicité de nos expériences nous aurait entraîné vers de trop amples développements.

Nous ne croyons manquer ni à la précision ni à la clarté en ne rapportant brièvement que les types les plus frappants de nos observations, tout en signalant, quand il y a lieu, les particularités rencontrées.

Autant que possible, nous suivrons dans l'exposé de nos recherches expérimentales, l'enchaînement des faits que nous avons provoqués et observés.

Ainsi, après avoir dans un aperçu général défini les Corynébactéries, situé leur place dans la classification, et, relaté à propos des corpuscules métachromatiques, les principaux travaux antérieurs, nous ferons dans une suite de chapitres la description de nos techniques et des résultats obtenus.

Nous montrerons quelques rapports entre l'aspect cytologique et les caractères biologiques de plusieurs variétés de corynébactéries pour essayer enfin d'en établir les conséquences, les commentaires critiques et les conclusions.

CHAPITRE PREMIER

APERÇU GÉNÉRAL

A) CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES ET CLASSIFICATION DES CORYNÉBACTERIES DIPHTÉRIQUES. — B) LE GROUPE DES ACTINOMYCÈTES. — C) CARACTÈRES CYTOLOGIQUES. — D) EXPOSÉ DES PRINCIPAUX TRAVAUX SUR LES CORPUSCULES MÉTACHROMATIQUES.

Tout d'abord, avant de montrer les modifications morphologiques et cytologiques, déterminées expérimentalement chez des Corynébactéries, nous indiquerons brièvement la définition et la situation des espèces étudiées (1); enfin, nous citerons les principaux travaux publiés, portant sur un caractère important, les corpuscules métachromatiques, que nous envisagerons plus particulièrement.

A. — Caractères morphologiques et classification

On admet généralement que les bacilles diphtériques et pseudo-diphtériques font partie du genre *Corynebacterium*, dont le nom (2) rappelle une forme rencontrée assez communément chez eux.

(1) Nous laisserons de côté dans ces recherches le bacille de la morve considéré par certains auteurs comme une corynébactérie.

(2) De *κρυνή* (massue).

En effet ces microbes se présentent, à l'examen microscopique, le plus souvent comme des bâtonnets de dimensions très variables ($1\text{ }\mu\text{ }5$ à 7 ou $8\text{ }\mu$) ; souvent leurs extrémités sont plus ou moins renflées en spatules, ce qui leur donne un aspect caractéristique.

On distingue dans la pratique bactériologique trois espèces :

1° Le bacille diphtérique vrai (*corynebacterium diphtheriae*, *Læffler*) qui peut se présenter sous trois variétés (L. Martin) mesurant entre 2 et $7\text{ }\mu$. C'est la forme longue, grêle et mince qui est la plus typique : avec certains procédés de coloration, on décèle presque toujours dans son cytoplasma, des corpuscules métachromatiques. Au point de vue des caractères biologiques, ce bacille détermine la fermentation des sucres, sauf celle du saccharose et de la mannite : on peut également le cultiver en présence ou en l'absence de l'air (anaérobiose).

2° Le bacille pseudo-diphtérique (*corynebacterium pseudo-diphtheriticum*, *Hoffmann*) plus petit que le premier ($1\text{ }\mu\text{ }5$ à $4\text{ }\mu$). Le type le plus fréquemment rencontré est en forme de grain d'orge (L. Martin) ou de navette (Barbier). En culture, il n'attaque aucun sucre : la présence de l'air lui est indispensable. Certains auteurs (1) affirment qu'il est toujours dépourvu de corpuscules métachromatiques, d'autres (2) estiment

(1) R. DEBRÉ et R. LETULLE. Le diagnostic rapide du bacille diphtérique, *Presse médicale*, 11 septembre 1919.

(2) AVIRAGNET, WEILL-HALLÉ, MARIE. Diagnostic de la diphtérie, *Journal médical français*, janvier 1920.

que l'on ne saurait souscrire sans réserves à ces assertions.

3° Le bacille banal de la peau (*corynebacterium xerosis*, Neisser) ou *bacillus cutis commune* (Ch. Nicolle) a plus d'un trait de ressemblance avec le bacille diphtérique vrai. On décèle dans son protoplasme des corpuscules métachromatiques très nets que Neisser avait découverts en 1888. En cultures, il est le plus souvent aérobic, attaque tous les sucres, y compris le saccharose.

Tous ces bacilles prennent et gardent le Gram : ils présentent sur les frottis une disposition fréquente et typique dite « en palissade ». Ils peuvent se rencontrer sous des aspects très polymorphes suivant les conditions de cultures ainsi que nous le verrons plus loin. Ces formes sont appelées formes d'involution.

B. — Le groupe des actinomycètes.

Certains auteurs (1) très autorisés réunissent le groupe *corynebacterium* au groupe tuberculeux (*mycobacterium*) et au groupe *actinomyces* pour former une famille importante intermédiaire aux champignons et aux bactéries, et désignée sous le nom d'*actinomycètes*.

L'importance de cette fusion se précise quand l'on considère, d'une part, les nombreux points de similitude

(1) LEHMANN et NEUMANN, *Manuel de bactériologie*, p. 522. Traduction française du Docteur PHILIBERT. BAILLERE, éditeur.

entre les trois groupes (2) (*corynebacterium*, *mycobacterium*, *actinomyces*) et, d'autre part, les affinités qui les relie aux hyphomycètes ou champignons filamenteux (3).

Mais le genre *corynebacterium* qui se rapproche le plus des bactéries possède aussi une grande variabilité et ses caractères morphologiques peuvent parfois évoquer des aspects mycéliens.

Comme le fait remarquer Pergola (4), on peut rencontrer dans la même espèce « des formes naines de $1\ \mu$ à $2\ \mu$ 5 et des formes géantes de $15\ \mu$ avec ramifications latérales élégantes, longues de $7\ \mu$.

Les microphotographies reproduites donneront une idée du polymorphisme de quelques individus et l'on pourra aussi remarquer bien des ressemblances avec la disposition des actinomyces.

Dröeschler (5) décrit chez les actinomycètes un mycelium aérien avec des arborisations ou des feutrages, suivant les milieux, tandis que le centre du thalle se compose d'un protoplasme vacuolaire avec des corpuscules métachromatiques.

(2) Dans son *Traité de bactériologie*, MAGÉ rapproche les cladothrix de *corynebacterium diphtheriae* et de *mucobacterium tuberculosis*, t. II.

— MASSOL et GRYZEZ, Antigènes et anticorps communs de la diphtérie et de la tuberculose, *Soc. Biologie*, t. LXXVII, 1914.

(3) Le professeur VUILLEMIN classe actinomyces parmi les hyphomycètes microsiphonés, groupe contigu aux schizophytes ou bactériacées, dans *Les Champignons, Essai de classification*, p. 235 O. Doin.

(4) M. PERGOLA, Indagini considerazioni su alcune proprietà del bacillo difterico con speciale riguardo di granuli metacromatici (*Ann. d'Igiene*, avril 1919, t. XXIX).

(5) Charles DRESCHLER, Morphology of the genus actinomyces (*Botan. Gazette*, janvier et février 1919, t. LXVII).

Ces descriptions sont à rapprocher de celles de Concetti, de Spirig (6). Ce dernier a vu, dans les cultures de diphtériques un mycelium aérien comme celui des moisissures avec des ramifications portant des conidies, organes de dissémination.

Ces faits montrent toute la série des variations d'un microorganisme : tantôt formant de véritables feutrages mycéliens ou des voiles « aranéux » à la surface des cultures, tantôt se fragmentant en éléments nombreux plus ou moins petits.

Par cette dissociation, le végétal, suivant la pittoresque expression de Van Tieghem, « s'émiette et se pulvérise » sans doute sous l'influence de causes biologiques, chimiques ou physiques qui règlent sa morphologie en même temps que ses échanges osmotiques.

C. — Caractères cytologiques des Corynébactéries.

Quand on emploie certains procédés de colorations que nous indiquerons plus loin, on peut observer dans le cytoplasme des bacilles qui nous occupent deux sortes de formations :

1° Des bandes transversales, chromophiles, donnant à la cellule bactérienne un aspect tout particulier, dû à l'alternance de zones claires et sombres, aspect désigné sous le nom de « striation zébrée ».

Ces disques ne donnent pas le phénomène de la mé-tachromasie ; quelquefois, en préparation fraîche, on peut les voir se fusionner.

(6) W. SPIRIG, Die Streptothrix (actinomyces) Natur der diphteriebacillus (*Centralblatt für Bakt.*, XXVI, 1890).

Ils correspondent sans doute aux éléments nucléaires décrits par Vejdowsky et Mencl (1) chez d'autres bactéries.

Nakanishi (2), dans les observations faites en coloration vitale de beaucoup de bacilles pathogènes, avait aussi distingué ces formations et les avait différenciées d'avec les corpuscules polaires des bacilles diphtériques.

1 2° Les corpuscules métachromatiques se présentent comme des masses rondes ou ovalaires, plus ou moins nombreuses dans un même bacille. Ils sont caractérisés par certaines affinités tinctoriales que nous étudierons particulièrement.

Auparavant, il paraît utile de parcourir rapidement les recherches déjà poursuivies à propos des corpuscules métachromatiques.

D. — Principaux travaux sur les corpuscules métachromatiques.

Depuis leur découverte par Babès (3) en 1887, on n'a cessé d'étendre l'observation de ces granulations protoplasmiques et d'en étudier la signification.

Prises d'abord pour des spores, puis pour des éléments nucléaires par Babès, ces formations cytoplasmiques furent considérées par Bütschli comme des « grains sporogènes » et appelées « grains rouges » en raison du phénomène de la métachromasie.

(1) MENCL. *Centralblatt. f. Bakt.*, t. XII, 1904, abt. II.

— VEJDOVSKY. *Centralblatt. f. Bakt.*, t. XI, 1904, abt. II.

(2) NAKANISHI. *Centralbl. f. Bakt.*, b. XXX, 1901, n° 3, p. 153.

(3) BABÈS. *Congrès international d'hygiène*, Vienne.

Ernst (4) et Neisser (5) ayant vu ces granulations chez *Corynebacterium xerosis*, avaient adopté pour les mettre en évidence le procédé de la double coloration.

Cependant la valeur et le rôle de ces corpuscules métachromatiques étaient loin d'être élucidés. Marx et Woithe (6), après une série de recherches méthodiques sur un grand nombre de bactéries pathogènes aboutirent à la conclusion que ces formations cytoplasmiques résultaient d'une condensation et d'une localisation de la substance chromophile; ce phénomène, selon ces auteurs, était le signe d'une grande activité. « Plus une espèce est loin de sa souche, disaient-ils, plus le nombre des individus granuleux diminue. »

En résumé, pour Marx et Woithe, ces corpuscules métachromatiques représenteraient « le substratum de la vie spécifique », « le signe et le symbole de la lutte », « le critérium de la virulence ».

Longtemps on devait rester sous l'influence de cette manière de voir et quelques années plus tard, Behring, au Congrès de la Tuberculose en 1906, annonçait qu'il avait extrait de la métachromatine du bacille de Koch, une substance mille fois plus toxique que la tuberculine.

Les granulations métachromatiques devaient donc être considérées comme des grains toxigènes.

Mais rien dans la suite n'est venu fonder cette assertion.

(4) ERNST. *Zeitschrift für Hygiene*, 1889.

(5) NEISSER. *Zeitschrift für Hygiene*, 1888.

(6) MARX et WOITHE. *Centralblatt. f. Bakt.*, 1900, Bd XXVIII, n° 2, p. 33.

Cependant, A. Meyer (1) et Grimme étudiaient les corpuscules métachromatiques chez *spirillum volutans* et chez *bacillus alvei*. Ils leur donnaient le nom de « grains de volutine ». Leur opinion était qu'ils devaient être des matières de réserves.

L'ensemble des recherches de Guilliermond (2), notamment sur les levures, les maszellen du sang et quelques bactéries confirmèrent ce point de vue.

La présence des corpuscules métachromatiques semblait assez générale dans la série biologique, et déjà on émettait l'hypothèse qu'ils étaient formés d'un composé nucléoprotéique.

Reichenow (3) démontre, par des recherches expérimentales sur une algue, *Hæmatococcus pluvialis*, l'importance du phosphore dans la genèse de ces formations.

En ce qui concerne les corpuscules métachromatiques des bacilles diphtériques, Lesieur (4) avait montré la contingence de ce caractère cytologique, et, cependant, avait conclu que la réaction d'Ernst-Neisser était la méthode de choix pour le diagnostic rapide des bacilles diphtériques.

(1) A. MEYER. *Botanische Zeitung*, 1904, abt. I.

(2) GUILLIERMOND. Recherches cytologiques sur les levures, *Thèse doctorat es-sciences*, Paris, et *Revue générale de Botanique*, 1903.

— GUILLIERMOND et MAVAS. Caractères histo-chimiques des granulations des Mastzellen, *Soc. Biologie*, 1908.

— Voir aussi *Bulletin Institut Pasteur*, 1906, Gram de volutine; *Bulletin Institut Pasteur*, 1907, Cytologie des bactéries.

(3) REICHENOW. Recherches sur *Hæmatococcus Pluvialis*, *Arbeiten aus dem Kais. Gesundheitramte*, 1909.

(4) LESIEUR. Les bacilles pseudo-diphtériques, *Thèse de Lyon*, 1901.

Schumberg (3) donne une série de 150 cas cliniques pour conclure que l'apparition et la fréquence des granulations chez les bactéries pathogènes ne vont pas toujours « la main dans la main » avec la gravité de l'évolution clinique.

L'importance des recherches récentes de Tribondeau et Dubreuil (4), Martin et Loiseau (5), Costa, Troisier et Dauvergne (6), Stévenin (7), Debré et Letulle (8), Aviragnet et M^{lle} Le Soudier (9) ont éclairé la question de la différenciation des bacilles diphtériques au moyen de la coloration et des caractères biologiques des cultures. De l'ensemble de ces faits complexes, il faut remarquer que l'on a pu déceler les corpuscules métachromatiques chez la plupart des Protistes (10); les levures, certaines algues et moisissures les présentent ainsi que beaucoup d'éléments cellulaires des plantes et des organismes supérieurs.

Nous allons voir que les granulations des Corynébactéries sont assimilables en tous points aux corpuscules métachromatiques des autres microorganismes.

(3) SCHUMBERG. Les rapports des corpuscules d'Ernst-Babés avec la virulence des bactéries, *Centralbl. f. Bakt. original*. Bd. XXXI, 1902.

(4) TRIBONDEAU et DUBREUIL. Procédé de coloration des granulations polaires du b. diphtérique, *Soc. Biologie*, 31 mars 1917.

(5) MARTIN et LOISEAU, *Soc. Biologie*, 1916, t. LXXIX.

(6) COSTA, FROISIER et DAUVERGNE. Diagnostic bactériologique de la diphtérie, *Presse médicale*, 1919, n° 13.

(7) STÉVENIN. Le bacille court et la diphtérie, *Journal de physiologie et de pathogénie génér.*, t. XVIII, n° 3, 1919.

(8) DEBRÉ et LETULLE, *loc. cit.*, page

(9) AVIRAGNET et M^{lle} LE SOUDIER. Caractères différentiels entre le b. de Lœffler et le b. d'Hoffmann, *Archiv. de médecine des enfants*, 1918, t. XXI.

(10) CONTE et VANEY. *Acad. des Sciences*, t. CXXXV, 1902.

Nous chercherons ensuite à savoir s'il est possible de les faire apparaître expérimentalement chez des espèces qui en sont naturellement privées, et à connaître enfin quelles peuvent être les conséquences biologiques de cette acquisition.

CHAPITRE II

CYTOLOGIE DESCRIPTIVE

A) TECHNIQUES EMPLOYÉES: 1° COLORATIONS SUR FROTTIS;
2° MÉTACHROMASIE; 3° COLORATIONS VITALES.

B) RÉSULTATS ET OBSERVATIONS CYTOLOGIQUES.

Pour mieux étudier la cytologie des corynébactéries et leurs corpuscules métachromatiques, c'est en préparations fraîches que nous avons cherché à mettre en évidence toutes les formations de la cellule bactérienne.

Concurremment à la méthode de coloration vitale, décrite plus loin, nous avons utilisé des frottis témoins pour contrôler les résultats obtenus.

A. — TECHNIQUES EMPLOYÉES

1° Colorations sur frottis

Ces frottis ont été traités par le procédé de la double coloration, habituellement pratiqué en bactériologie clinique.

La *fixation au formol* a retenu nos préférences ; cette substance chimique immobilise l'état protoplasmique ; son rôle de mordant pour aider à la coloration est des plus utiles. On s'en est servi pour mettre en évidence

les granulations contenues à l'intérieur du bacille de Koch (1).

A. Mayer (2) remarque que la « volutine traitée par le formol pendant trente minutes ne se dissout plus dans l'eau bouillante ». Cet avantage est donc précieux à cause de l'emploi à chaud du bleu de méthylène.

Des expériences nombreuses et comparatives nous ont confirmé ces indications.

Nos frottis ont donc été fixés par le formol pur commercial à 40 0/0 pendant 20 ou 30 minutes.

Au lieu de la solution acide de *bleu de méthylène*, nous avons adopté la *solution alcaline* (3) à 1 % que nous laissons agir immédiatement après le formol et assez longuement après un chauffage léger. Il faut noter que les colorations lentes sont en effet particulièrement propices pour déceler les détails cytologiques.

La *vésuvine* en solution à 2 %, selon les indications de Debré et Letulle (4), donne une excellente recoloration faisant ressortir la nuance bleu-noir des granulations et la striation zébrée fréquente des bacilles diphtériques.

Pour éprouver la valeur de ce procédé nous l'avons appliqué systématiquement à tous nos frottis et les résultats en ont toujours été concordants et fidèles, soit pour les granulations des Corynébactéries, soit pour les

(1) C. BIOT. Assoc. anatomistes, *Congrès de Lyon*, 1901.

— F. ARLOING et R. BIOT. *Bulletin Société études scientif. sur la tuberculose*, juin 1913.

(2) A. MEYER, *loc. cit.*, p. 118.

(3) VAN ROVAART. Zur neisserchen Färbung der Dipht. bacillus, 1901, *Centralbl. f. Bakt.*, t. XXIX.

(4) DEBRÉ et LETULLE, *loc. cit.*, Sp.

corpuscules métachromatiques des levures, du cryptocoque de Rivolta, du bacillus alvei, etc.

Par surcroît, nous avons souvent employé des colorants à composition complexe tel le *bleu polychrome*.

Toujours après fixation par le formol on laisse agir ce colorant pur pendant deux à trois heures : le temps délicat est la *différenciation par l'éther glycérique* (3) étendu de 70 à 80 % d'eau distillée. Cette différenciation peut être plus ou moins poussée.

Les granulations se voient en rouge ou en mauve, tandis que les bacilles sont incolores; quelquefois on distingue les stries transversales en bleu.

Nous avons déjà dit que les granulations sont susceptibles d'être décelées dans les cellules de levures par la méthode de la double coloration.

D'autre part, en déposant des levures dans une goutte d'eau entre lame et lamelle et en ajoutant une trace de colorant métachromatique (bleu de méthylène, bleu de Nil), on voit apparaître, en rouge, dans la vacuole de ces levures des corpuscules métachromatiques animés de mouvements browniens (1).

On pouvait penser que l'on aurait des résultats analogues avec des bacilles diphtériques traités par la coloration vitale.

Avant d'exposer les résultats obtenus, il nous semble utile de donner quelques indications sur la métachromasie afin d'en mieux étudier les phénomènes.

(3) Voir dans le précis de microscopie, M. LANGERON, 1916, p. 442, les indications techniques de ce réactif.

(1) GUILLIERMOND. Les levures. O. DOIN, p. 74.

2^e Métachromasie

Lorsque, pour colorer des éléments cellulaires ou des microbes, on se sert de certaines substances chimiques, on constate que toutes les parties de ces éléments n'apparaissent pas avec la même teinte : par exemple, les unes seront rouges avec un colorant bleu, les autres jaune-orange avec un colorant rouge.

On dit alors qu'il y a métachromasie.

Ce changement de couleur se manifeste au contact de substances que l'on appelle *chromotropes* ou plus ordinairement *métachromatiques* 2.

Prenant (3) définit la métachromasie comme la propriété de se colorer dans un bon solvant de celui qui donne habituellement le réactif colorant.

Pour Ehrlich, la métachromasie consiste dans le fait qu'un corps chimiquement défini colore différents éléments avec des nuances différentes.

Parmi les colorants métachromatiques, que l'on oppose aux colorants orthochromatiques, on peut citer le rouge neutre, les bleus de méthylene, de toluidine de Nil, la thionine et le violet de méthyle.

Ces substances chimiques sont des sels solubles dans l'eau et facilement dissociables, d'une part en une base de nuance différente insoluble dans l'eau mais soluble dans les graisses et leurs solvants, d'autre part en un acide incolore.

Aussi, d'après Hansen, la métachromasie serait expri-

(2) M. LANGEROX, *loc. citat.*

(3) FERNANT, *Méthodes et résultats de la microbiologie, Manuel de l'enseignement et de la pratique*, 1904, p. 342.

quée chimiquement par la mise en liberté des molécules de la couleur basique et ces molécules seraient fixées par certaines substances, parmi lesquelles il est intéressant pour nous de noter les lipoides et les acides gras.

Prenons l'exemple du bleu de Nil : cette matière colorante forme une solution aqueuse bleue; la teinte rouge de la base est alors masquée. Mais, si une substance alcaline déplace cette base, on peut aussitôt la mettre en évidence par un solvant approprié.

Dans trois tubes, A, B, C, on met une solution aqueuse de bleu de Nil et, après avoir alcalinisé très légèrement avec une trace de soude, on ajoute en A de l'éther, en B du chloroforme, en C, de l'huile végétale.

On obtient, après agitation : à la surface du premier tube une couche d'éther en rouge; au fond du deuxième tube le chloroforme aussi en rouge; enfin, l'huile du troisième tube reste encore rouge, au-dessus de la solution aqueuse demeurée bleue, là comme dans les autres tubes.

Nous avons pu réaliser d'une autre manière l'expérience précédente due à Giemsa.

Un sac de collodion (pareil à ceux qu'on utilise pour les cultures intrapéritonéales, est rempli de chloroforme; on le met dans une solution de bleu de Nil légèrement alcalinisée, ou inversement, une éprouvette pleine de chloroforme reçoit un sac de collodion contenant du bleu de Nil.

Le colorant imprègne d'abord la membrane cellulosique et, suivant la rapidité de l'osmose, le chloroforme se teinte en rose, puis en rouge.

Ces exemples permettent de *voir in vitro l'action des colorants métachromatiques*, dont les propriétés (virage, dissociation par base ou acide, solubilité plus ou moins grande dans divers liquides) rendent très étendue et très variée la gamme des teintes possibles.

On conçoit alors comment ces colorants peuvent servir de réactifs, de détecteurs optiques, des détails cytoplasmiques de la cellule bactérienne vivante, détails qui, sans eux, passeraient inaperçus.

3° Colorations vitales

Nakanishi (1) et, avant lui, Bizzozero, avaient employé du bleu de méthylène dilué en traces très faibles dans du liquide d'ascite, du sérum sanguin, ou même le propre milieu où le microbe s'était développé.

D'après l'auteur japonais, la coloration, d'abord un peu diffuse, se différencie graduellement. Nakanishi ne semble pas avoir noté d'une manière aussi précise que Rowland (2) la teinte rouge feu des granulations.

Le phénomène de la métachromasie a un intérêt particulier chez la cellule vivante, mais, avant de pouvoir appliquer la coloration vitale aux bacilles diphtériques, il était nécessaire d'adapter la technique à des conditions physiologiques et, pour cela :

a) de régler la tonicité de la solution colorante sur celle du milieu de culture ;

b) de s'assurer de l'innocuité de la substance chimique vis-à-vis de la cellule bactérienne.

(1) NAKANISHI, *loc. cit.*

(2) ROWLAND. Transactions of the Jenner Institute of preventiv medicine, 1899, 2^{me} série.

a) *Conditions de tonicité relatives*

1° On met en suspension une parcelle de culture de bacilles diphtériques dans divers liquides : soit dans du sérum physiologique à 9 0/00 du sérum sanguin de cheval normal, du bouillon ordinaire peptoné, soit dans les mêmes liquides étendus plus ou moins d'eau distillée, soit encore dans de l'eau de condensation des cultures solides, ou simplement de l'eau distillée.

On réalise la coloration vitale en ajoutant à la lamelle qui doit recouvrir la goutte de liquide, des traces de solution étendue et alcaline de bleu de Nil, traces si faibles que, par transparence, la teinte du milieu soit à peine perceptible. Après un temps variant de deux à dix minutes, les bacilles apparaissent colorés en bleu très clair, tandis que les granulations ont déjà pris la teinte rose, rouge, mauve ou violette. — Ces colorations dans les conditions optima, persistent assez longtemps, une heure environ.

2° Culture de vingt-quatre heures, en bouillon (bacilles diphtériques vrais), mise en suspension dans l'eau distillée.

Coloration longue à apparaître (10'), teinte rose élective des granulations, tandis que le corps bacillaire reste diaphane ou légèrement teint en bleu; les granulations semblent se gonfler et leurs dimensions dépassent celles des bacilles.

3° Culture de vingt-quatre heures, en bouillon, mise en suspension dans de l'eau salée à 9 0/00 ... Coloration rapide, élective et presque immédiate des granula-

tions qui semblent se contracter; leur teinte rouge s'accroît et vire bientôt au rouge Bordeaux.

4° Culture en *milieu solide* (milieu Costa saccharosé), en suspension dans l'eau de condensation du tube. — Les granulations apparaissent en une ou deux minutes au plus, avec leur teinte métachromatique : si l'on a fait en sorte que les bacilles soient adhérents à la lame de verre, on peut spécialement bien étudier leur cytoplasme.

Il résulte de ces observations que, pour les cultures solides, le meilleur milieu de coloration est l'eau de condensation du tube de culture, liquide qui offre entre autres l'avantage d'être à la même température que les bacilles sortant de l'étuve.

Pour les cultures liquides, il est préférable de diluer du sérum physiologique avec 50 0/0 d'eau distillée.

B. — Action du colorant sur la vitalité des bacilles.

La durée des observations faites en coloration vitale permettait de penser que les substances chimiques employées, même à l'état de traces, ne pouvaient pas être nocives pour la vitalité des bacilles.

Les expériences suivantes ont vérifié cette hypothèse :

1° Une culture en bouillon ordinaire, teinté faiblement de bleu de Nil, se développe normalement; après treize jours, un repiquage en bouillon donne au bout de vingt-quatre heures un trouble homogène et des bacilles normaux.

2° Une goutte de sérum physiologique dilué et additionné de bouillon, est teintée par des traces de bleu de

Nil : on y dépose des bacilles diphtériques et on met le tout en suspension dans une cellule de Böttcher.

Après avoir vérifié au microscope la métachromasie des granulations, on met à l'étuve la cellule de Böttcher pendant cinq heures.

Au bout de ce temps, on fait desensemencements avec la goutte sur du sérum coagulé.

Les résultats ne sont positifs qu'au bout de quarante-huit heures, mais, dès lors, le développement des cultures est régulier et les colonies sont composées de bacilles dont la forme, les dispositions, les affinités tinctoriales sont normales.

Nous verrons plus loin comment l'on pourrait commenter ces phénomènes de coloration vitale : nous devons maintenant esquisser différents types observés à l'aide de cette méthode, et analyser divers détails cytologiques des corynebactéries diphtériques.

B. — Résultats et observations cytologiques

On sait que sur les frottis, les corpuscules métachromatiques des bacilles diphtériques se présentent sous la forme de masses ovalaires ou rondes, situées habituellement aux extrémités du microbe (granulations polaires), quelquefois au milieu et même, chez certains individus, elles forment comme une théorie dans le cytoplasme.

En coloration vitale, on retrouve ces dispositions classiques, mais avec la teinte métachromatique dont la nuance peut se modifier plus ou moins au cours de l'examen.

Alors que, dans les cellules de levures, on voit ces corpuscules métachromatiques animés de mouvements browniens, grossir, se fusionner, puis changer de teinte en s'accolant comme une coiffe à la paroi de la vacuole, on ne remarque, chez les bacilles diphtériques, que la couleur, la disposition et la forme spéciale de ces granulations, le plus ordinairement immobiles.

Cependant, il est possible de surprendre, chez certaines formes d'involution, des mouvements browniens des granulations, situées alors dans des renflements en spatule : mais ce sont là, pour ainsi dire, des trouvailles de micrographie, et le plus souvent on ne distingue, dans ces crosses terminales, que des zones bleues figurant comme un accent circonflexe contre les parois.

Ces formes d'involution sont celles qui se prêtent le mieux à l'observation cytologique. On les trouve facilement dans les cultures de bacilles diphtériques vrais, développés sur un milieu dysgénésique, comme le milieu Costa saccharosé (1). On peut alors rencontrer les aspects les plus polymorphes, des formes en raquette, en battant de cloche, des masses rondes, des filaments ramifiés avec des renflements et des appendices plus ou moins longs et grêles, des éléments contournés et paraissant aplatis. Chez la plupart, on retrouve des granulations, mais elles présentent des dimensions relativement grandes (0μ 7) dans les crosses terminales (1μ de diamètre environ), ces crosses semblent avoir une paroi assez épaisse et, laté-

(1) Voir microphotographie, pl. II, 1.

ralement, elles offrent quelquefois un ou deux prolongements assez courts et minces.

Nous verrons plus tard la capacité de résistance de ces formations.

On voit parfois aussi les bacilles en spatules s'articuler avec d'autres éléments moins larges et ramifiés : cet aspect rappelle celui d'un mycélium.

Une culture de *B. cutis commune* développée en voile, nous a permis de voir, en coloration vitale, des bacilles assez larges et de dimensions moyennes. Un des bacilles observés avait à un pôle une granulation ronde, teintée en bleu, tandis qu'au milieu, on distinguait des formations discoïdes en rouge.

Au bout de quelques minutes, ces dernières se fusionnaient et confluaient à l'autre pôle en une masse ovulaire bleue.

Chez d'autres éléments, en forme de massue très large, on voyait de petites granulations se réunir peu à peu.

Chez les bacilles diphtériques de formes typiques, les corpuscules métachromatiques donnent des teintes métachromatiques très nettes et l'on peut ainsi voir très clairement leur disposition, mais on ne note chez ces formes aucune autre particularité.

D'autres bacilles que les Corynébactéries donnent des colorations semblables, avec les mêmes procédés.

Le bacille de la Loque⁽¹⁾ (*Bacillus alvei*) présente les mêmes réactions tinctoriales que les bacilles diphtériques, mais on n'observe pas chez lui des formes aussi

(1) Maladie des abeilles.

fortement atypiques. — Ces bacilles contiennent tantôt deux granulations, tantôt plusieurs autres médianes, ces corpuscules deviennent le point de départ de formation de spores.

Certaines variétés de streptocoque (courtes chaînettes) peuvent avoir de très fins corpuscules métachromatiques colorés en rouge, en préparation vitale, par le bleu de Nil.

Chaque individu d'une chaînette contient alors une granulation.

Chez le cryptocoque de la lymphangite épizootique du cheval, on peut voir les mouvements browniens des corpuscules métachromatiques dans la plupart des éléments.

Maintenant que nous nous sommes rendu compte des principaux aspects et de la colorabilité des granulations des Corynébactéries, nous allons rechercher si, par des influences expérimentales, il n'est pas possible de faire acquies des granulations à des bacilles qui en sont ordinairement dépourvus.

CHAPITRE III

EYTOLOGIE EXPERIMENTALE

CONDITIONS FAVORISANT L'APPARITION DES CORPUSCULES MÉTACHROMATIQUES: A) VARIATIONS DES FACTEURS PHYSIQUES; B) VARIATIONS DES CONDITIONS BIOLOGIQUES ET TROPHIQUES.

Si l'absence de granulations dans des bacilles isolés de la région amygdalienne d'un malade, jointe aux autres caractères bactériologiques récemment ajoutés par divers auteurs (1), permet le diagnostic clinique différentiel des bacilles diphtériques vrais et des bacilles pseudo-diphtériques, la possibilité de voir apparaître les corpuscules métachromatiques chez *Corynebacterium pseudo-diphtheriticum* met en relief la variabilité de la morphologie bactérienne.

L'assimilation des granulations des Corynébactéries aux corpuscules métachromatiques des autres micro-organismes permet de mieux comprendre leur genèse :

Les hypothèses de Meyer, les analyses de Kossel, les observations de Guilliermond, ont autorisé à penser que ces formations cytoplasmiques chez les levures,

(1) MARTIN et LOISEAU, COSTA, TROISIER, DAUVERGNE, DEBRÉ et LETULLE, AVIRAGNET, etc., *loc. cit.*

étaient composées surtout de nucléo-protéïdès, substances complexes riches en phosphore, comme tendaient du reste à le faire supposer les affinités pour les colorants (Giemsa).

Reichenow, dans l'intéressante étude sur *Hæmatococcus pluvialis* avait montré qu'en cultivant cette algue dans un milieu riche en azote, mais dépourvu de phosphore, on assistait à la disparition complète des corpuscules métachromatiques.

Par contre, Lesieur (1) avait conclu, à la suite de ses expériences : « nous avons vu des bacilles diphtériques perdre leurs granulations, jamais nous n'en avons pu faire apparaître chez ceux qui en sont dépourvus ».

Neisser avait noté la nécessité de la culture sur sérum coagulé pour l'obtention des granulations abondantes des bacilles diphtériques et Lesieur, à son tour, remarque encore que les cultures en bouillon et sur agar ne prêtent guère à la constatation du phénomène.

De plus, les granulations semblent disparaître peu à peu à mesure que l'âge de la culture s'avance.

Enfin, certaines espèces de Corynébactéries (type Hoffmann) se signalent par l'inconstance ou même l'absence de ce caractère.

L'irrégularité de ce phénomène, sans doute conditionné par des causes mal connues, nous a poussé à chercher à le déterminer en faisant varier quelques-uns des facteurs complexes présidant au développement des colonies bactériennes.

Nous nous occuperons des influences physiques, bio-

(1) LESIEUR, in thèse : Les bacilles pseudo-diphtériques, p. 98.

lologiques, chimiques ou trophiques vis-à-vis de nombreux échantillons des trois espèces de Corynébactéries diphtériques.

A) Variations des conditions physiques

Pression, concentration saline et température

On sait que la tension gazeuse influe sur la morphologie des organismes inférieurs et sur la végétabilité des microbes.

S. Arloing et Neumann (1) avaient montré, en 1898, que des cultures de bacilles diphtériques soumises à la pression de huit atmosphères sont retardées dans leur évolution et ont un aspect plus jeune que les témoins développés à l'air libre.

Cependant, le degré de concentration saline semblait influencer davantage la morphologie et, en tous cas, on pouvait penser que la pression agissait surtout en facilitant la dissolution des gaz dans le liquide des cultures, ces gaz ayant alors une influence chimique.

On rapprochait de ce fait que certains auteurs (2) considéraient les granulations comme des substances oxydables, qu'en coloration vitale, la métachromasie de ces formations semble particulièrement intense sur les bords de la préparation, zones plus riches en oxygène.

D'autre part, nous avons observé que les bacilles gra-

(1) NEUMANN. Influence de la tension gazeuse sur les microbes et en particulier sur les b. dipht. *Thèse de Lyon*, 1898.

(2) DIETRICH et LIEBERMEISTER, *Centralblatt f. Bakt.*, 1902, t. XXXII.

nuleux sont fréquents sur les voiles et rares dans les dépôts des cultures sur milieux liquides.

1° *Pression et concentration saline*

Nous avons donc soumis à la pression de trois atmosphères, pendant plusieurs jours, trois espèces de *Corynébactéries* :

1) Cultures liquides : bouillons salés à 9 0/00 et bouillons non salés.

Milieux solides : sérum de cheval normal coagulé et milieux Costa.

Des témoins sur milieux semblables sont mis à l'air libre.

Au bout de vingt-quatre heures : aucune différence avec les cultures-témoins, en ce qui concerne les granulations.

Au bout de quatre et huit jours : mêmes résultats.

Particularités. — Aucun développement dans les milieux non salés; la fermentation des sucres a été légèrement retardée pour les cultures soumises à la pression (1).

2° *Concentration saline et température*

Milieux liquides et solides à divers titres de concentration saline, soumis à des températures différentes, variant entre 37° et 40° :

1° A 39°-40°, bouillons non salés : commencement de culture en dépôt.

(1) *Thèse Neumann*, Lyon 1898, *loc. citat.*

— P. REGNARD. Note sur les conditions de la vie dans les profondeurs des mers. (*Mémoire à la Société de Biologie*, 1884.)

Au bout de vingt-quatre heures : développement accentué par l'agitation (frottis : bacilles petits, peu de granulations).

2° A 39°-40° : bouillons ordinaires : on a toujours une culture normale et un voile dont les éléments sont granuleux.

3° A 39°-40° : bouillons hyperchlorurés 11 0/00 : dépôt précoce, puis persistant. — Bacilles moyens ; peu de granulations.

4° Résultats d'autres expériences comparatives :

• Milieux liquides ou solides, avec teneur saline *hypertonique*: dépôts ou colonies maigres ;

Milieux liquides ou solides avec concentration saine *hypotonique*: mêmes résultats ;

Milieux liquides ou solides, avec teneur saline *isotonique* (conditions favorables aux échanges osmotiques) bacilles normaux et granuleux (suivant l'espèce), évolution typique des colonies.

B. Variations des conditions biologiques et trophiques

I. Cultures in vivo

Par la méthode d'ensemencement en sacs de collodion dans le péritoine de lapin, Lesieur avait réussi à rendre long et granuleux un bacille court, trapu et sans granulations. Nous avons eu encore recours à ce procédé, qui offre l'avantage de faire des cultures « in vivo » avec les milieux liquides les plus favorables.

1° Deux séries d'expériences sont faites avec six variétés de *Corynebacterium pseudo-diphtheriticum*, dépourvues de granulations :

Durée de l'inclusion : six à huit jours.

Résultats négatifs : aucune modification morphologique.

2° Autre série d'expériences avec deux variétés de *B. cutis commune* : bouillon ordinaire ; deux sacs de collodion : races A et B. — Bouillon phosphaté ; un sac de collodion : race A.

Durée de l'inclusion intrapéritonéale : six jours.

Examen des cultures. — Bouillon ordinaire, A et B : bacilles clairs, non granuleux. — Bouillon phosphaté, A' : bacilles granuleux. — Repiquage de A' : les bacilles perdent leurs granulations (1) et donnent une abondante végétation qui reproduit bientôt une voile très dense, avec des formes d'involution très remarquables et très granuleuses (2).

II. Cultures in vitro

1° *Milieux liquides*. — Bouillons obtenus avec de la chair de poisson marin (3), ou avec du thymus de veau (nucléoprotéides). — Ensemencements avec *C. pseudo-diphthériticum* dépourvu de granulations.

Résultats négatifs : la végétation des bacilles se fait toujours en dépôt, comme on l'a constaté dans les bouillons phosphatés : les éléments constituant ce

(1) Cette perte des granulations coïncidant avec une brusque multiplication permet de rapprocher ce fait de celui observé par Reichenow : la division cellulaire d'une algue entraîne la disparition de ces corpuscules métachrom., *loc. cit.*, p.

(2) Les bacilles claviformes sont représentés planche II, n° 2.

(3) HARDE et HAUSER. Milieu de culture au poisson et préparation d'une toxine, *Soc. de Biologie*, 13 nov. 1919.

dépôt sont des bacilles petits, très chromophiles, mais toujours dépourvus de granulations.

2° *Milieu solides*. — Nous avons remarqué qu'une solution d'acide nucléique et de phosphates, ajoutée en petite quantité à une culture âgée de bacilles diphtériques vrais devenus peu granuleux, augmentait le nombre de corpuscules métachromatiques très sensiblement.

L'addition aux sérums coagulés d'une combinaison phosphorée ou d'un composé nucléo-protéique restait à essayer. Nous avons utilisé, pour préparer de nouveaux milieux, la technique décrite par Costa (1), mais en remplaçant le sucre par les substances dont on voulait éprouver l'action :

a) Milieu Costa, additionné de nucléo-protéides d'origine végétale (extrait total de levure de bière).

Trois variétés de bacilles pseudo-diphtériques, vérifiés sans granulations, sontensemencées.

Au bout de vingt-quatre heures, les frottis des trois cultures donnent une réaction de Neisser positive; la coloration vitale détermine la métachromasie de ces granulations.

La présence de ces corpuscules métachromatiques ne persiste pas au delà du troisième ou quatrième jour : certains bacilles conservent assez longtemps leurs granulations.

Les témoinsensemencés sur Costa glucosé demeurent dépourvus de corpuscules métachromatiques.

b) Milieu Costa lécithiné à 3 0/0 :

(1) COSTA, TROISIER et DAUVERGNE, *loc. cit.*

Trois variétés de bacilles pseudo-diphtériques sont ensemencées sur ces milieux.

En vingt-quatre heures : cultures abondantes; au frottis, on voit les dimensions des bacilles légèrement accrues (1). Granulations très abondantes, bipolaires, aussi nettes que celles des diphtériques vrais. En coloration vitale, métachromasie positive.

Ces granulations persistent plus longtemps sur ces milieux.

Toutes ces observations paraissent concorder pour faire admettre que la présence de substances phosphorées comme les nucléo-protéides ou les lipoides, tels que la lécithine, détermine l'apparition de corpuscules métachromatiques chez des bacilles qui en étaient dépourvus.

3° Cultures sur sérum de cobayes

Nous avons eu l'occasion de remarquer qu'un *C. pseudo-diphteriticum* sans granulations donnait des formes granuleuses quand on le cultivait sur du sérum coagulé de cobaye. Ce sérum contenait encore beaucoup d'hématies; on pouvait supposer qu'elles étaient la cause du phénomène.

En obtenant du sérum pur de cobaye, et en le faisant coaguler dans de petits tubes, il nous a été possible d'avoir à chaque ensemencement des résultats positifs (nombreuses granulations).

(1) Cf. pl. I, n° 2, une reproduction d'une préparation.

4° Cultures simultanées sur un même milieu

Nous avons tenté de faire, sur un même milieu, l'ensemencement de deux races de bacilles pseudo-diphtériques pour essayer de fixer un caractère transitoire.

1° Ensemencements simultanés sur milieu Costa glucosé de deux bacilles pseudo-diphtériques sans granulations, et provenant de cultures sur sérum normal :

Au bout de vingt-quatre heures : granulations très rares. — Bacilles de 3 à 4 μ plus grands que les bacilles des souches respectives. Cytoplasme très chromophile, présentant la striation zébrée aussi nettement que certains diphtériques vrais. Certains grands éléments paraissent formés par l'accolement bout à bout de deux bacilles et figurent un losange allongé, strié transversalement. Ces caractères n'ont pas persisté.

2° Repiquages simultanés sur milieu Costa glucosé, de deux bacilles pseudo-diphtériques provenant de cultures sur milieu Costa phosphoré, mais après raréfaction ou disparition presque totale des granulations.

En vingt-quatre heures : bacilles moyens, avec des granulations très abondantes.

Ces corpuscules métachromatiques deviennent rapidement très rares.

3° Repiquages simultanés sur milieu Costa phosphoré de bacilles pseudo devenus très granuleux.

En vingt-quatre heures : culture abondante ; bacilles moyens, avec corpuscules métachromatiques persistants.

Repiqués sur sérum normal, les bacilles perdent rapidement leurs granulations.

La présence des corpuscules métachromatiques chez les Corynébactéries semble donc liée à des influences trophiques; on peut les faire apparaître expérimentalement au moyen de substances phosphorées incorporées aux milieux de cultures, particulièrement aux milieux solides.

Ces granulations ne paraissent pas devoir être considérées comme un caractère spécifique absolu, à cause de l'inconstance de leur présence et de leur labilité.

Si, au cours du développement des cultures ou dans certaines conditions, elles semblent disparaître, il serait vraisemblable d'interpréter le phénomène comme Reichenow. Des bacilles très granuleux seraient donc susceptibles d'une multiplication très intense, mais cette division cellulaire entraînerait la raréfaction de leur granulation par suite de l'utilisation de ces matières de réserves.

CHAPITRE IV

CYTOLOGIE FONCTIONNELLE

CORPUSCULES MÉTACHROMATIQUES ET PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES. — RELATIONS AVEC: A) LE POUVOIR FERMENTATIF. — B) LES FORMES VÉGÉTATIVES. — C) LE POUVOIR PATHOGÈNE. — D) LA CAPACITÉ DE RÉSISTANCE.

En mettant à profit les expériences précédentes, nous allons essayer maintenant d'analyser les rapports qui lient ces corpuscules métachromatiques à l'activité fonctionnelle et aux propriétés biologiques des bacilles diphtériques et pseudo-diphtériques.

Considérées comme un produit d'élaboration cytoplasmique, ces formations peuvent et doivent subir des variations au cours du développement des cultures. Nous rechercherons si ces variations sont parallèles aux modifications des propriétés biologiques des bacilles.

En ce qui concerne les levures, Henneberg (1) assure que pendant la fermentation, les corpuscules métachromatiques augmentent de nombre, pour se raréfier quand le phénomène se ralentit.

(1) HENNEBERG. Sur la volutine des levures, *Central, f. Bakt.*, 1916, t. XLV, abt. II.

Le fait pouvait être intéressant à contrôler chez les Corynébactéries, dont le pouvoir de fermentation vis-à-vis de différents sucres est bien connu.

A) Les corpuscules métachromatiques et le pouvoir
fermentatif

Les milieux de cultures solides étant particulièrement favorables à l'acquisition des granulations, nos observations ont été faites sur des cultures développées sur les milieux au sérum coagulé, additionné de sucre et tournesolé (milieu Costa), ce qui nous donnait l'avantage de surveiller la marche de la fermentation.

1° *Corynebacterium commune*. — Sur milieux glucosé, saccharosé ou maltosé : Après virage du tournesol, les granulations des bacilles sont aussi abondantes que sur les cultures originelles ;

2° *Corynebacterium pseudo-diphtheriticum*. — Sur Costa phosphoré : pas de fermentation, mais acquisition de granulations ;

3° *Corynebacterium diphtheriæ*. — Cette espèce attaque le glucose mais laisse intact le saccharose ; or, soit en présence du premier sucre, soit en présence du second, on observe des granulations dès le début du développement.

Cultures sur Costa saccharosé : granulations constantes ; fermentation exceptionnelle.

Particularités. — Au bout de quatre à cinq jours, formes atypiques et granuleuses décrites plus haut.

Au bout de dix jours : ces formes deviennent ramifiées et enchevêtrées : filaments plus ou moins segmen-

tés, avec de grosses granulations dans les crosses terminales (1).

Repiquage sur Costa saccharosé : même évolution.

Repiquage sur Costa glucosé : retour aux formes typiques longues, avec granulations bipolaires (2).

Les corpuscules métachromatiques peuvent donc être abondants, en l'absence de toute fermentation et, réciproquement, le phénomène de la fermentation n'est pas lié à l'apparition des granulations.

B) Les corpuscules métachromatiques et les formes végétatives

Une série d'observations va nous renseigner au sujet des rapports possibles entre les granulations et le polymorphisme.

1° En milieux liquides, troubles homogènes. — Les granulations se présentent avec une grande irrégularité, sans jamais être abondantes.

2° Dans les végétations de dépôts. — Les granulations demeurent assez rares : ces dépôts se produisent surtout et d'une manière précoce dans les bouillons phosphatés, dans les bouillons au poisson ou au thymus de veau.

3° Sur les *voiles en surface*. — a) *Voile de formation tardive* provenant spontanément d'une végétation de dépôt :

C. diphteriæ, ensemencé sur bouillon phosphaté, donne un dépôt précoce ; le reste du liquide est limpide.

(1) Formes atypiques reproduites pl. II, n° 1.

(2) Formes reproduites pl. I, n° 1.

Après vingt jours, voile en surface : formes longues, très granuleuses et très ramifiées.

(Bouillon ordinaire témoin : formes de dégénérescence, sans granulations.)

Repiquage du voile sur bouillon glycérimé : dépôt précoce, granulations rares.

Après quatre jours : voiles avec formes en spatules très chargées en corpuscules métachromatiques.

b) *Voile de formation précoce.* — Culture en bouillon ordinaire de *B. cutis commune*. (Après passage, en sac de collodion, dans le péritoine d'un lapin.)

Après trente-six heures, voile très accentué et très dense : formes en spatules très larges et très granuleuses (1).

Repiquage en bouillon ordinaire : voile au bout de vingt-quatre heures : formes en spatules larges et bourrées de granulations : beaucoup de bacilles en V ouvert, dont les branches libres contiennent de grosses granulations.

Repiquage en bouillon au poisson : dépôt précoce ; bacilles chromophiles, granulations assez rares.

On constate, par ces quelques exemples, une abondance remarquable de granulations chez les formes typiques et atypiques des voiles ; par contre, une raréfaction notable de corpuscules métachromatiques chez les bacilles des végétations de dépôts.

C) Relations avec le pouvoir pathogène

Après beaucoup d'autres expérimentateurs, on se

(1) Formes atypiques reproduites pl. II, n° 2.

demande encore si les propriétés pathogènes ne correspondent pas, quelquefois au moins, à des variations morphologiques.

Les bacilles diphtériques et pseudo-diphtériques diffèrent par des caractères biologiques très nets, mais on a vu que dans certaines conditions, l'aspect cytologique peut devenir un aspect trompeur quand il s'agit de les différencier.

Lesieur (1) a montré qu'un bacille diphtérique peut acquérir de la virulence sans prendre des granulations. Beauverie et Guilliermond (2) ont décrit pour *Botrytis cinerea* parasite des végétaux, une forme pathogène sans corpuscules métachromatiques et une forme saprophyte pourvue au contraire de ces corpuscules.

On peut provoquer la mort du cobaye par l'inoculation d'un bacille diphtérique non granuleux.

Il restait à connaître le pouvoir pathogène de *Corynebacterium pseudo-diphtheriticum* (type Hoffmann) après l'acquisition expérimentale de corpuscules métachromatiques.

Les bacilles pseudo-diphtériques utilisés dans ces expériences provenaient tous de porteurs de germes ou d'angines légères; toutes les fois que nous avons observé la présence d'abondantes granulations chez ces bacilles, nous avons vérifié leur pouvoir pathogène par l'inoculation aux cobayes.

1° Cobayes inoculés avec C. pseudo-dipht. ayant

(1) LESIEUR. *Loc. citat.*

(2) BEAUVERIE et GUILLIERMOND. *Centralblat. f. Bakt.* 1903, abt. II, t. X.

acquis des granulations par cultures sur milieux Costa phosphorés : aucune réaction générale, ni locale ;

2° Cobayes inoculés avec *C. pseudo-dipht.*, variétés avec granulations obtenues par repiquages simultanés ou symbiose, sur un même milieu : aucune réaction générale, ni locale ;

3° Cobayes inoculés avec *C. pseudo-dipht.* présentant des granulations en cultures sur sérum de cobaye, trois repiquages successifs : mêmes résultats que précédemment ;

4° Chimiotaxie positive vis-à-vis des phagocytes de cobaye.

Dans l'une des expériences de la première série, nous avons pu nous rendre compte, aussitôt après l'inoculation, de la rapidité de la phagocytose : une trace de la sérosité rosée provenant de la piqûre avait été recueillie entre lame et lamelle et coloré vitalement.

On voyait l'englobement des bacilles par les phagocytes et les granulations de ces bacilles pouvaient être distinguées nettement par la métachromasie.

Les corpuscules métachromatiques ne semblent donc pas correspondre à une augmentation du pouvoir pathogène.

D) Relations avec la capacité de résistance

Si ces granulations paraissent être, chez d'autres microorganismes (*levures*, *B. alvei*), le produit d'une élaboration « prélude d'une fructification » (1), elles pourraient peut-être aussi, chez les corynébactéries,

(1) GUILLIERMOND. *Loc. citat.*

représenter des matières de réserves ou une condensation protoplasmique nécessaires à des formes de résistance.

Nakanishi (1) émettait l'hypothèse que les corpuscules métachromatiques avaient une grande capacité de résistance.

1° *Capacité de résistance aux actions biologiques*

Sérums antagonistes.

a) *Action du sérum antidiphtérique mixte* (2), *après coloration vitale* : une préparation de *C. diphteriæ* (cultures de vingt-quatre heures) est montée dans du sérum physiologique, additionné d'eau distillée.

On voit tout d'abord la membrane bactérienne se colorer en bleu pâle.

Au bout de dix minutes, la teinte métachromatique des granulations est intense, le reste du bacille est en bleu clair.

Addition d'une trace de sérum physiologique à 9 0/00 : aucun changement.

Addition d'une goutte de sérum de cheval normal : éclaircissement lent, effacement de la teinte bleue (membrane) ; (durée de l'observation : 20 à 30 secondes).

Addition d'une goutte de sérum antidiphtérique mixte : accentuation rapide de la décoloration ; en 10 secondes, le corpuscule métachromatique observé dimi-

(1) NAKANISHI. *Loc. citat.*

(2) Sérum antitoxique et bactériolytique.

nue et semble fondre comme un sucre dans l'eau; en 15 ou 20 secondes, il a disparu tout à fait (3).

Cependant, le corps bacillaire reste entier; si, à ce moment, on ajoute à nouveau du bleu de Nil, on n'obtient plus aucune coloration métachromatique.

b) *Sérum antidiphthérique mixte avant coloration.* On prépare deux pipettes stérilisées. L'une est remplie avec une émulsion de bacilles diphthériques dans un mélange de sérum de cheval et d'eau stérilisée; l'autre, avec ce même mélange mais additionné de sérum antidiphthérique mixte. Les pipettes sont scellées et mises à l'étuve. Au bout de deux à trois heures on fait avec le contenu des colorations vitales :

Première pipette : bacilles normaux ; teinte métachromatique des granulations (frottis témoin = granulations abondantes) ;

Deuxième pipette : amas de bacilles incolores (frottis témoin = bacilles clairs sans granulation).

c) Sérum antilevure.

Un cobaye reçoit à plusieurs jours d'intervalle deux inoculations de cultures de levures riches en corpuscules métachromatiques.

Au bout de dix jours, par ponction du cœur, on recueille du sang pour en essayer l'action du sérum vis-à-vis des corpuscules métachromatiques des levures.

Une préparation de levure est colorée vitalement avec du bleu de Nil : teinte rouge des granulations animées

(3) A. MEYER. (*Loc. citat.* p. 118.) Donne l'eau de javelle (hypochlorites alcalins) comme dissolvant la volutine des granulations de *b. alvei*.

de mouvements browniens dans la vacuole de la cellule de levure.

L'addition du sérum antilevure détermine l'arrêt des corpuscules métachromatiques, le virage de la teinte rouge en teinte bleue et une décoloration progressive mais incomplète. Une trace de sérum normal de cobaye ne produit qu'un éclaircissement léger.

Dans toutes ces observations il est à remarquer que ce sont les *granulations* qui paraissent *résister le plus longtemps* à l'action décolorante des sérums antagonistes ou bactériolytiques.

A cause de l'impossibilité d'une nouvelle coloration après cette action, on peut, semble-t-il, admettre que la substance des corpuscules métachromatiques se dissout dans les sérums.

2° *Capacité de résistance aux actions chimiques*

a) On a vu plus haut que l'action des colorants vitaux, intéressant surtout les corpuscules métachromatiques, n'a aucune action nocive sur la vitalité des bacilles.

b) Dans une préparation de *C. diphteriæ* colorée vitalement, on fait ruisseler entre lame et lamelle une trace de chloroforme : on assiste alors à l'envahissement de la préparation par une vague teintée en rose et tenant en suspension une infinité de petites sphères ; ces particules nombreuses surtout aux limites de la vague, sont animées de mouvements browniens, comme les micelles d'un liquide colloïdal, ou comme les corpuscules métachromatiques dans les vacuoles des levures.

Les bacilles diphtériques paraissent décolorés.

Une préparation témoin faite avec du sérum physiologique, du bleu de Nil et une trace de chloroforme ne donne pas ce phénomène.

3° *Capacité de résistance aux actions physiques*
(température)

On utilise deux souches de *C. diptheriæ* avec formes atypiques et ramifiées : on distingue de gros corpuscules métachromatiques inclus dans les crosses terminales plus ou moins épaissies.

Ces massues sont peut-être douées d'une résistance particulière. Nous avons pratiqué pour cette épreuve le procédé indiqué par Lehmann et Neumann (1).

a) Les cultures développées sur milieu Costa saccharosé sont émulsionnées dans leur eau de condensation après addition de sérum physiologique.

On répartit dans quatre petits tubes (deux pour chaque souche) et on les soumet au bain-marie à 70°.

Au bout de deux minutes : on retire un tube de chaque culture et l'on ensemence (sérum et bouillon).

Au bout de huit minutes : même technique pour les derniers tubes ; en 48 heures cultures sur sérum = résultats nuls ; cultures en bouillon = légère végétation, en dépôt, de bacilles petits et sans granulations.

b) Même technique employée avec quatre autres souches de *C. diptheriæ* développées dans les mêmes conditions. Après 8 minutes à 80°, tous les ensemencements faits sur bouillon ordinaire ont été négatifs.

La résistance des formes particulièrement granuleu-

(1) LEHMANN et NEUMANN. *Loc. citat.* p. 49.

ses n'est pas très marquée vis-à-vis des influences thermiques.

En résumé, on peut considérer les granulations des bacilles diphtériques comme le produit d'une élaboration cytoplasmique, exigeant pour se manifester des conditions trophiques favorables.

La présence des corpuscules métachromatiques n'est pas un phénomène concomitant avec la fermentation; elle se produit de préférence chez les formes de Corynébactéries végétant en surface; elle n'est pas liée aux variations du pouvoir pathogène des espèces.

Ces granulations sans doute contiennent des lipoïdes et sont chromotropes vis-à-vis de certains colorants : ce sont ces formations cytoplasmiques de la cellule bactérienne qui résistent le plus longtemps aux actions décolorantes des sérums antagonistes, mais elles ne montrent pas une capacité de résistance très grande vis-à-vis des influences thermiques.

Suivant l'opinion de certains auteurs, ces corpuscules métachromatiques représenteraient des matières de réserves qui seraient utilisées lors d'une division cellulaire active, par exemple la multiplication rapide des bacilles.

CHAPITRE V

EXAMEN SYNTHETIQUE

INTERPRÉTATION ET COMMENTAIRES DES RÉSULTATS OBTENUS

Claude Bernard rapporte (1) que son maître Magendie se comparaît en tant qu'expérimentateur à un chiffonnier : « Avec mon crochet à la main et ma hotte sur le dos, disait-il, je parcours le domaine de la science et je ramasse ce que je trouve ».

Nous avons essayé, dans les pages précédentes, de faire un classement de nos recherches; on nous permettra maintenant d'envisager l'ensemble de nos observations.

Il est utile en effet de les examiner synthétiquement, de les comparer entre elles, de les corroborer avec les résultats d'autres expérimentateurs, de les discuter et d'en dégager enfin la portée biologique et les applications pratiques.

A) Remarques diverses à propos du polymorphisme.

Sans aller jusqu'à reprendre l'histoire du polymor-

(1) CL. BERNARD. Leçons sur les effets des substances toxiques et médicamenteuses, p. 13. BAILLIÈRE, éditeur, 1883.

phisme, nous croyons faire ici quelques considérations générales au sujet des variations morphologiques des Corynébactéries.

On admet avec Roger (1) que, pour les bactéries, « la variabilité des formes ne dépasse pas celle rencontrée chez les autres organismes ».

Sans doute à cause de leur évolution rapide, on suit plus aisément, chez les protistes, ces sortes d'oscillations plus ou moins amples, écartant momentanément l'espèce du type normal.

Le polymorphisme naturel ou normal s'oppose au polymorphisme accidentel ou pathologique.

1° *Polymorphisme normal*

Il paraît dû à un cycle évolutif, accentué chez tous les organismes inférieurs, ainsi l'on trouve une alternance de formes très marquée nécessaire à la végétabilité de certains champignons.

Danysz (2), après des recherches expérimentales, considère un microbe comme un être à croissance continue et illimitée dont les unités cellulaires deviennent libres et semblables en vivant dans des conditions identiques (structure dissociée).

Si cette indépendance ne se produisait pas, il se manifesterait tôt ou tard dans la masse de l'être une différenciation de formes et de caractères correspondant aux fonctions diverses d'un être complexe.

(1) ROGER. Traité de pathologie générale de Bouchard, t. I.

— GRASSET. Traité élémentaire de physiopathologie clinique, t. II, p. 222.

(2) DANYSZ. La vie d'un microbe, individu et espèce. Acad. des Sciences, 15 juillet 1919.

Nous ajouterons donc qu'au point de vue biologique, il est vraisemblable de penser que les variations morphologiques des bactéries sont dues le plus souvent à des influences trophiques, à des conditions osmotiques : cette plasticité bactérienne est une conformation à des exigences vitales qui peuvent se produire aussi bien dans les humeurs d'un organisme que dans les milieux de culture d'un laboratoire.

2° *Polymorphisme dysgénésique*

Il est donc possible, comme nous l'avons vu, de faire varier le type d'une espèce bactérienne, dans de certaines limites, en modifiant les conditions du milieu.

La concentration saline peut provoquer des formes de dégénérescence chez les bactéries : nous avons déjà eu l'occasion avec mon ami Biot (1) de remarquer chez les trypanosomes du rat « des formes dysosmotiques que ces flagellés revêtaient dans les milieux anisotoniques ».

A la suite de recherches récentes, on va jusqu'à penser que certains types de végétation bactérienne sont causés par des phénomènes de tension superficielle, dont on découvre, petit à petit, le rôle capital dans l'immunité.

Oliviero (2) considère que la tension superficielle est sous la dépendance de l'adhésion moléculaire ; les composés salins ont peu d'influence sur la production

(1) R. BIOT et G. RICHARD. Société de pathologie exotique, t. V, 11 décembre 1912.

(2) OLIVIERO. Revue de pathologie comparée, 1920. Considérations sur la tension superficielle des liquides.

du phénomène, tandis que les composés organiques à molécule complexe en ont beaucoup. C'est ainsi que la saponine ajoutée en quantités très faibles à un bouillon de culture augmente la quantité de microbes par le seul fait de sa présence.

Govaerts (3) estime que dans les septicémies la stabilité des microbes dans le sang est « la condition essentielle de l'infection », que l'agglutination est le résultat de phénomènes d'attraction et de tension superficielle.

Rappelons enfin la modification de caractères que S. Arloing a imposé au bacille de Koch en déterminant, par l'agitation des cultures en bouillon glycérimé, une végétation en trouble homogène.

Nous avons vu que dans certains milieux liquides les Corynébactéries restent en dépôt alors qu'elles forment un trouble homogène ou parfois spontanément un voile en surface dans d'autres conditions.

On remarque d'ailleurs que dans la circulation du sang la multiplication des bacilles diphtériques est possible mais très rare.

Ces faits sont dus sans doute à des conditions exceptionnelles, ces bacilles végétant naturellement à la surface des liquides ou sur un substratum solide.

Les recherches expérimentales d'Arloing et Chantre (4), de Charrin et Guignard, de P. Courmont, de

(3) GOVAERTS. Quelques données expérimentales sur la signification des septicémies. *Presse médicale*, 1918. (Travaux de l'ambulance Océan-La Panne.)

(4) S. ARLOING et E. CHANTRE. Sur les variations morphologiques et pathogéniques de l'agent de l'infection purulente chirurgicale. *Ach. de physiologie*, n° 4, octobre 1895.

F. Arloing et Nicolas, et de bien d'autres, ont montré la possibilité d'influencer la morphologie bactérienne par diverses substances.

A. Gautier et Lambling (1) affirment que la spécificité chimique de la cellule est en corrélation avec la morphologie.

Nous avons relaté plus haut les modifications de la cytologie bactérienne suivant les variations des conditions trophiques.

B) Commentaires des observations cytologiques en coloration vitale.

1° Rôle de la membrane bactérienne

Nos expériences de métachromasie faites « in vitro » avec des sacs de collodion, nos colorations vitales des bactéries en préparations fraîches, l'action décolorante des sérums antagonistes peuvent, pour ainsi dire, aider à comprendre les faits qui se passent au niveau de la membrane d'enveloppe des microbes.

On sait qu'Overton (2) a montré que la perméabilité de la cellule pour certains corps est liée à la solubilité de ces corps pour le ou les constituants sans doute lipoidiques de cette membrane.

Or nous avons constaté au moyen de la métachromasie que certaines matières colorantes peuvent imprégner la membrane bactérienne à l'état vivant, atteindre le cytoplasme et colorer d'une manière spé-

(1) LAMBLING. Précis de Biochimie. MASSON, 1920, p. 146.

(2) OVERTON, *Jahre wissent. Botan.* 1900, t. XXXIV.

ciale les corpuscules métachromatiques dont la substance dissout la base de ces colorants.

Nous avons d'abord fait les épreuves nécessaires pour nous assurer que ce phénomène était un phénomène compatible avec la vie.

Puis, d'autres observations nous ont permis de suivre l'action lytique de sérums antimicrobiens grâce à leur pouvoir d'imprégnation spécifique de la membrane bactérienne et à leur action consécutive sur le cytoplasme lui-même.

D'ailleurs, certaines bactéries, munies d'une capsule protectrice empêchant ou retardant cette action sérique, ont par ce fait leur virulence accrue (Levaditi).

Enfin, pour Mackenzie (1), les sérums et vaccins autogènes doivent sans doute leur valeur au pouvoir lipasique, destructeur de la constitution lipoprotéinique de la membrane bactérienne.

2° Nature et signification des corpuscules métachromatiques

La métachromasie des granulations nous donne un aperçu des affinités chimiques pouvant s'exercer entre les formations cytoplasmiques et certains groupements moléculaires d'une substance déterminée.

Les travaux de nombreux auteurs (Erhlich, Mesnil) ont éclairé la valeur thérapeutique de quelques corps chimiques comme les couleurs de benzidine, pour atteindre les microbes dans leur vitalité sans nuire cepen-

(1) SHAW MACKENZIE. Sur le mécanisme de l'immunité, rôle de la lipase. The lancet. t. CXCVII, 8 nov. 1919.

dant aux éléments cellulaires de l'organisme parasité.

Et l'on a vu que l'étude de ces actions peut donner des précisions utiles sur la nature de quelques constituants de la cellule bactérienne.

On admet à la suite de Giemsa que l'affinité du noyau pour les colorants est due à sa richesse en acide métaphosphorique.

De même, après les hypothèses de Mayer, les analyses de Kossel, les travaux de Grimme et les observations de Guilliermond, on estime la substance des corpuscules métachromatiques formée surtout d'acide nucléique.

Nous avons vu en effet que l'addition de certains composés nucléoprotéiques ou lipoïdes (licithine) aux milieux de culture fait apparaître des granulations chez les bacilles pseudo-diptériques.

Si parfois on peut constater ce phénomène se produire sur certains sérums (sérum de cobaye), on peut penser que leur teneur en licithine est très variable (2 0/00 après les repas).

Le rôle du phosphore indispensable dans les phénomènes biologiques est encore souligné ici : constituant essentiel des tissus vivants, des noyaux des éléments cellulaires, adjuvant utile des actions diastasiques, le phosphore se retrouve encore dans l'élaboration des substances de réserves, propres à chaque être vivant.

Guilliermond remarque que la vultine ou substance des granulations métachromatiques convient très bien comme matière de réserve précisément en raison de sa nature complexe (1).

(1) GUILLIERMOND. Bull. I. P. 1906, p. 197.

Aussi Lambling (1) explique la diversité des fonctions et des spécificités cellulaires « par l'intervention des lipoïdes phosphorés et surtout les protéiques, composés pour lesquels on prévoit un nombre presque illimité de variétés chimiques ».

Le rôle des corpuscules métachromatiques paraissant formés principalement de ces composés, semble donc être bien celui d'une matière de réserve, analogue au vitellus, et sans doute destiné à la reproduction ou aux besoins de l'être lors d'une division nucléaire répétée.

On peut voir en effet les corpuscules métachromatiques disparaître, chez les levures, au moment de la formation des asques (Guilliermond) et, chez *Hæmatococcus pluvialis*, au moment d'une division cellulaire (Reichenow).

Chez les Corynébactéries on pourrait croire que les granulations facilitent la dissémination des bacilles qui, munis de substances de réserves, sont capables ainsi de se multiplier rapidement dans une occasion favorable.

Ce caractère (absence ou présence de granulations) n'est donc rien moins qu'attaché à une espèce ; il ne semble pas qu'on puisse le considérer comme une base certaine pour une détermination différentielle.

Il en résulte qu'au point de vue clinique, la sérothérapie précoce dans un cas probable de diphtérie doit être pratiquée suivant la conclusion de L. Martin et

(1) LAMBLING. *Loc. citat.*, p. 147.

Darré (1) « avant le résultat de l'examen bactériologique ».

Cet examen bactériologique garde toute son utilité et sa nécessité au point de vue pronostique (associations microbiennes) et au point de vue hygiénique et prophylactique.

Si ces études de cytologie expérimentale n'ont fait qu'ajouter une confirmation de plus à des préceptes cliniques, il nous avait paru intéressant d'exposer et de commenter simplement nos recherches et nos résultats, croyant avec Claude Bernard, que « dans l'investigation scientifique, les moindres détails sont de la plus haute importance ».

(1) L. MARTIN et DARRÉ, Traitement par le sérum antidiphthérique. *Journal médical français*, janvier 1920.

CONCLUSIONS

I. — Les caractères différentiels généralement admis en clinique pour la diagnose des bacilles diphtériques et des bacilles pseudo-diphtériques, basée sur la morphologie et la cytologie (présence ou absence de granulations) paraissent suffisants dans la pratique.

Ils ne constituent pas toutefois des caractères bactériologiques strictement spécifiques en raison de leur contingence et de leur variabilité.

II. — On peut, en effet, dans certaines conditions expérimentales, faire apparaître des granulations chez des bacilles pseudo-diphtériques qui en sont ordinairement dépourvus.

Leur aspect peut ainsi se confondre avec celui des bacilles diphtériques vrais.

III. — Les Corynébactéries diphtériques possèdent également dans leurs formes typiques et leurs formes atypiques dites d'involution, des granulations cytoplasmiques contribuant à mettre encore en évidence les degrés de similitude existant entre les trois espèces : *corynebacterium diphtheriae*, *corynebacterium pseudo-diphtheriticum*, *corynebacterium xerosis*,

IV. — De même que les granulations de *C. diphtheriæ* et de *C. xerosis*, les granulations de *C. pseudo-diphtheriticum* sont colorables par le procédé d'Ernst-Neisser et la méthode de coloration vitale. Cette dernière technique illustre les affinités de ces corpuscules pour des groupements moléculaires déterminés de certains colorants (métachromasie).

V. — D'une façon générale, l'apparition de granulations chez les bacilles des groupes diphtériques dépend de conditions trophiques favorables, en particulier, de la présence dans les milieux nutritifs d'une combinaison phosphorée (nucléoprotéide).

VI. — Les formes granuleuses des corynébactéries sont nettement plus abondantes sur milieux solides.

En cultures liquides on les trouve plus fréquemment chez les bacilles se développant en voile que chez ceux végétant en dépôts.

VII. — Le pouvoir fermentatif sur les sucres, de même que le pouvoir pathogène paraissent indépendants de la présence des corpuscules métachromatiques.

Les bacilles granuleux n'offrent pas une résistance plus marquée aux actions modificatrices biologiques, chimiques ou physiques.

VIII. — Le pouvoir lytique des sérums antagonistes se manifeste nettement sur les corpuscules métachromatiques.

Les modifications de leur aspect, après coloration vitale, permettent de suivre la marche de la bactério-

lyse. Parmi les formations de la cellule bactérienne soumise à l'action des sérums antimicrobiens, ce sont les granulations qui résistent le plus longtemps.

Ainsi l'on peut voir après coloration vitale, les sérums normaux décolorer seulement la membrane bactérienne, tandis que l'action des sérums antimicrobiens s'exerce sur le cytoplasme tout entier et sur les corpuscules métachromatiques.

IV. — L'acquisition expérimentale par *C. pseudodiphtheriticum* de caractères cytologiques habituels à *C. diphtheriæ* doit retenir aussi bien l'attention du bactériologiste que celle du clinicien.

Cette variabilité morphologique, pouvant s'accompagner probablement d'une semblable variabilité du pouvoir pathogène, justifie encore les réserves de certains auteurs, lyonnais en particulier, se refusant à établir une démarcation absolue entre les bacilles granuleux ou non, trouvés dans les régions amygdalienne et naso-pharyngienne et d'en donner des conséquences formelles au point de vue hygiénique et prophylactique.

X. — Au point de vue biologique, les corpuscules métachromatiques des Corynébactéries semblent en tous points assimilables, en raison de l'identité de leurs réactions tinctoriales et de leur genèse, à ceux observés chez d'autres microorganismes.

XI. — Présentant la même variabilité de caractères que d'autres espèces microbiennes, les Corynébactéries sont en outre susceptibles de revêtir des formes atypiques rappelant certains aspects mycéliens.

XII. — Dans la famille des Actinomycètes où on les classe actuellement, les Corynébactéries se placent comme un groupe intermédiaire entre les bactéries et les champignons avec lesquels elles ont plusieurs degrés de similitude.

Aussi leur étude comporte un grand intérêt biologique.

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE.

ARLOING.

Vu,

LE DOYEN,

L. HUGOUNENQ.

Vu et permis d'imprimer

Lyon, le 15 mai 1920

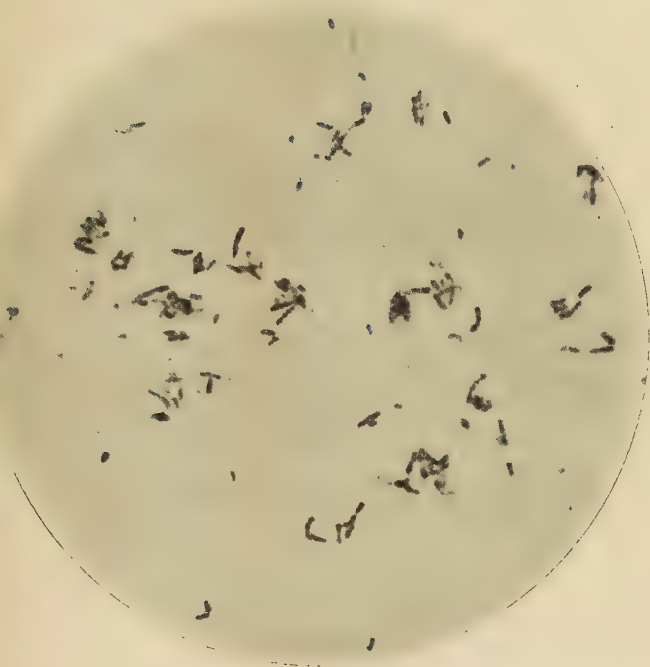
LE RECTEUR,

PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,

P. JOUBIN.

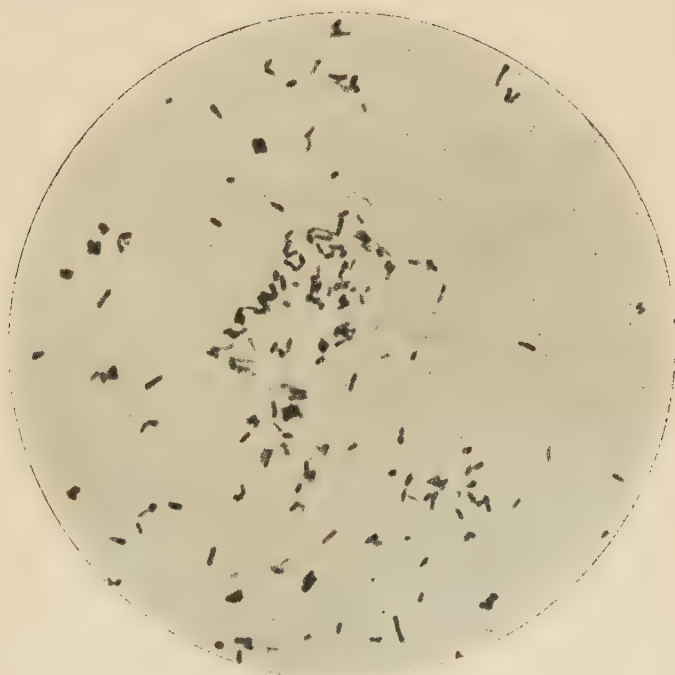
Pl. I.

(Gross. 1350 D)



1. — *Corynebacterium*
diphtheriæ

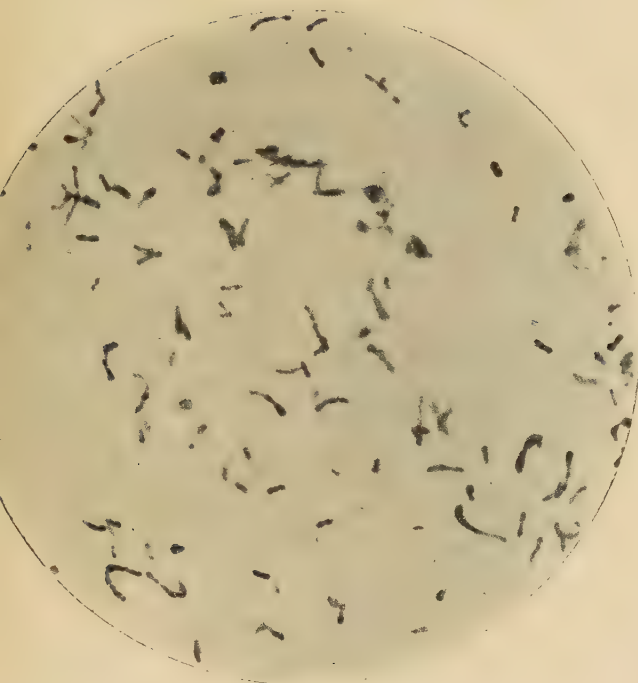
(*Formes normales*)



2. — *Corynebacterium*
pseudo-diphtheriticum

(*Formes granuleuses*)

Pl. II.
(Gross. 1350 D)



1. — *Corynebacterium*
diphtheriae

(*Formes atypiques*)

2. — *Corynebacterium*
serotiosum (*B. Cutis commune*)

(*Formes granuleuses*)

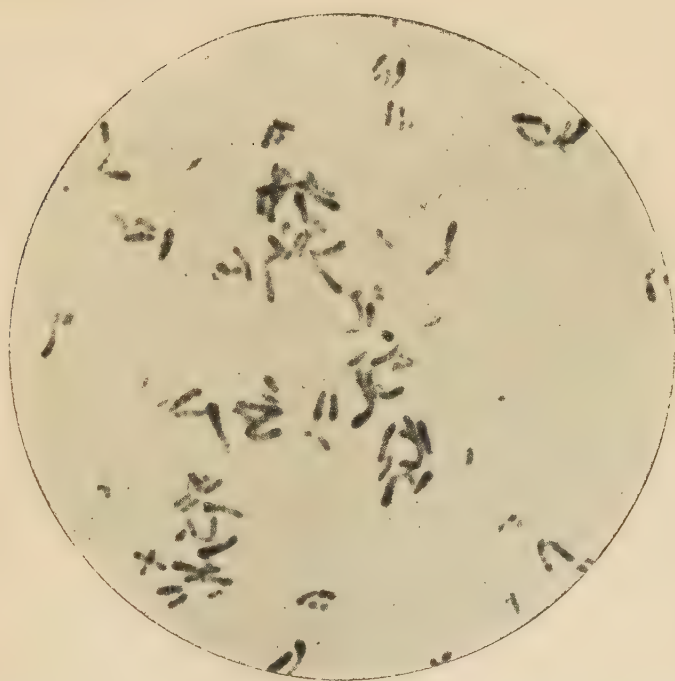


TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS	7
CHAPITRE PREMIER. — Aperçu général	11
A. Caractères morphologiques et classification des Corynébactéries	11
B. Le groupe des Actinomycètes.....	13
C. Caractères cytologiques des Corynébactéries.....	13
D. Exposé des principaux travaux sur les corpuscules métachromatiques	16
CHAPITRE II. — Cytologie descriptive	21
A. Techniques employées :	
1° Colorations sur frottis.....	24
2° Métachromasie	24
3° Colorations vitales	26
B. Résultats et observations cytologiques.....	29
CHAPITRE III. — Cytologie expérimentale	33
Conditions favorisant l'apparition de corpuscules mé- tachromatiques	33
A. Variations des facteurs physiques.....	35
B. Variations des conditions biologiques et trophiques:	
I. Cultures <i>in vivo</i>	37
II. Cultures <i>in vitro</i>	38
CHAPITRE IV. — Cytologie fonctionnelle	43
Corpuscules métachromatiques et propriétés biologi- ques. Relations avec :	
A. le pouvoir fermentatif..	44
B. les formes végétatives.....	45
C. le pouvoir pathogène.....	46
D. la capacité de résistance.....	48
CHAPITRE V. — Examen synthétique	54
Interprétations et commentaires des résultats obtenus	
A. Remarques diverses à propos de polymorphisme..	54
1° Polymorphisme normal	55
2° Polymorphisme dysgénésique.....	56
B. Commentaires et observations cytologiques d'a- près les colorations vitales.....	58
1° Rôle de la membrane bactérienne.....	58
2° Nature et signification des corpuscules méta- chromatiques	59
CONCLUSIONS	63

IMPRESSIONS DES
DEUX - COLLINES



RUE DAVOUT, 3
L Y O N

